Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. H. Franke

Stoffwechselveränderungen unter Einwirkung von VASODISTAL vor und nach ergometrischer Belastung

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Helmut Klum

aus Eisenfeld

Würzburg, den 2. November 1981

1982

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. H. Franke

Stoffwechselveränderungen unter Einwirkung von VASODISTAL vor und nach ergometrischer Belastung

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Helmut Klum

aus Elsenfeld

Würzburg, den 2. November 1981

Referent:	Prof. Dr. med. W. Gross
Korreferent:	Prof. Dr. med. H. Franke
Dekan:	Prof. Dr. med. K.-A. Bushe

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Januar 1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

MEINER FAMILIE

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543522_0072

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	VERSUCHSABLAUF	3
	1. Untersuchungsgut	3
	2. Versuchsaufbau	3
	2.1. Voruntersuchung	3
	2.2. Erstversuch	4
	2.3. Zweitversuch	6
III.	LABORMETHODIK	7
	1. ATP-Bestimmung	7
	1.1. Prinzip	7
	1.2. Bestimmungsmethode	8
	1.2.1. Reagenzien	8
	1.2.2. Enteiweißung	8
	1.2.3. Bestimmungsansatz	9
	2. Bestimmung der Glucose	9
	2.1. Prinzip	9
	2.2. Bestimmungsmethode	10
	2.2.1. Reagenzien	10
	2.2.2. Enteiweißung	10
	2.2.3. Bestimmungsansatz	10
	3. Pyruvatbestimmung im Vollblut	11
	3.1. Prinzip	11
	3.2. Bestimmungsmethode	11
	3.2.1. Reagenzien	11
	3.2.2. Enteiweißung	12
	3.2.3. Pufferung	12
	3.2.4. Bestimmungsansatz	12

Seite

4. Lactatbestimmung 12
4.1. Prinzip 12
4.2. Bestimmungsmethoden 14
4.2.1. Reagenzien 14
4.2.2. Enteiweißung 14
4.2.3. Bestimmungsansatz 14
5. Bestimmung des Hämatokrits 15
6. Bestimmung des Natrium- und Kaliumgehalts von Serum u. Vollblut 15
7. Berechnung des Natrium- und Kaliumsgehalts der Erythrozyten 15
8. Ergometrie 16
9. Statistische Auswertung 16

IV. ERGEBNISSE 17
1. Verhalten von ATP im Vollblut 17
2. Verhalten von Glucose im Vollblut 18
3. Verhalten von Pyruvat im Vollblut 20
4. Verhalten von Lactat im Vollblut 21
5. Verhalten des Hämatokrits 22
6. Verhalten von Natrium im Vollblut 23
7. Verhalten von Natrium im Serum 24
8. Verhalten von Natrium in Erythrozyten 25
9. Verhalten von Kalium im Vollblut 26
10. Verhalten von Kalium im Serum 27
11. Verhalten von Kalium im Erythrozyten 28

V. DISKUSSION 29

VI. ZUSAMMENFASSUNG 36

LITERATURVERZEICHNIS I - III

I. EINLEITUNG

Arteriosklerose ist die häufigste Ursache cardiovaskulärer Erkrankungen, die in den Industrieländern an der Spitze der Todesursachenstatistiken stehen. Man nimmt heute an, daß die Häufigkeit und Verbreitung der Arteriosklerose mit Lebensweise und Ernährungsgewohnheiten in Zusammenhang stehen. Welcher Art dieser Zusammenhang ist, wie die Kausalkette im einzelnen verläuft und warum bei gleichen äußeren Bedingungen ein Mensch an Arteriosklerose erkrankt und der andere nicht, wie genetische und Umweltfaktoren zusammenwirken, ist noch Gegenstand der Forschung.

Es gibt eine Vielzahl von Medikamenten, die auf verschiedene Weise eine Verbesserung der arteriellen Durchblutung zum Ziel haben. Als ein körpereigener Wirkstoff, der die arterielle Durchblutung verbessern soll, ist das Kallikrein bekannt. Davon ausgehend wurde als pharmakologisches Präparat die Substanz PADUTIN entwickelt. GROSS et al. untersuchten in Stoffwechselstudien die Auswirkungen dieses Präparats auf ATP, Glucose, Pyruvat und Lactat vor und nach spiroergometrischer Belastung.

Eine andere körpereigene Substanz, die eine starke gefäßerweiternde Wirkung besitzt, ist das Adenosin. Im Skelettmuskel wird Adenosin von dem sich in Tätigkeit befindlichen Muskel physiologisch freigesetzt, wenn im Muskel eine Hypoxie auftritt,und ruft eine kompensatorische, den jeweiligen Verhältnissen angepaßte, lokale Gefäßerweiterung hervor.

Es sind eine Reihe von pharmakologischen Präparaten bekannt, welche die Wirkung von Adenosin erhöhen. Dazu gehören z.B. Dipyridamol, Hexobendin, Lidoflazin und Dilazep. Für unsere Untersuchung wählten wir das 4-(3,4,5-trimethoxycinnomoyl)-1-(N-pyrollidincabonyl-methyl) piperazine (im folgenden VASODISTAL), das nach CASTELLANI et al. ebenfalls die gefäßerweiternde Wirkung des Adenosins potenziert. Dabei stellte sich die Frage, ob es unter den Belastungsbedingungen der Ergometrie möglich ist, signifikante Unterschiede im Verhalten von ATP, Glucose, Pyruvat und Lactat sowie der Konzentrationen von Natrium und Kalium im Serum, Vollblut und Erythrozyten nachzuweisen, insbesondere ob und inwieweit sich die Stoffwechselwirkungen dieser das Adenosin beeinflussenden Substanz mit den von GROSS et al. gefundenen Werten der unter anderem auch gefäßaktiven Substanz Kallikrein (PADUTIN) vergleichen lassen.

II. V E R S U C H S A B L A U F

1. Untersuchungsgut

Der praktische Teil dieser Arbeit fand in der Zeit vom 11. September bis 7. Dezember 1978 statt. In 44 Untersuchungen wurden 22 freiwillige, männliche Probanden untersucht, von denen zwei wegen Unverträglichkeit des zu untersuchenden Präparates ausfielen. Die untersuchten Personen waren keine Leistungssportler, drei von ihnen betrieben aber regelmäßig Sport.

Der jüngste Proband war 18,7 Jahre, der älteste 35,6 Jahre alt. Das Gewicht wurde jeweils vor den Versuchen ermittelt, das Durchschnittsgewicht lag bei 72,2 kg.
Das höchste Gewicht betrug 92 kg bei einer Größe von 187 cm, das geringste 56,5 kg bei 174 cm.

2. Versuchsaufbau

Die Untersuchung gliederte sich in 3 Abschnitte:

(a) Voruntersuchung
(b) Erstversuch
(c) Zweitversuch

2.1. Voruntersuchung

In der Voruntersuchung sollten kranke Probanden ausgeschieden werden. Vor jeder ergometrischen Belastung wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

(a) Blutbild: Zählung der Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten, Bestimmung des Hämoglobins, Hämatokrits, des mittleren korpuskulären Volumens und des Hb_E.

(b) Blutsenkung:

(c) Serumelektrophorese: $alpha_1$-, $alpha_2$-, beta-, gamma-Globuline, Albumine, Gesamteiweiß

(d) Serumanalyse: Natrium, Kalium, Kalzium, anorg. Phosphat, Gesamtbilirubin, Albumin, Eisen, Kupfer, Magnesium, LDH, alk. Phosphatase, Cholesterin, Glucose, Harnstoff, Stickstoff, Harnsäure, Kreatinin, Triglyceride, GOT, GPT, gamma-GT.

(e) Ruhe-EKG

(f) allgemeine klinische Untersuchung.

Sämtliche Probanden waren, soweit diese Parameter eine Beurteilung zulassen, gesund.

2.2. Erstversuch

Vor der ergometrisöchen Belastung wurde im Rahmen der Dissertation von HÖRLIN eine Lungenfunktionsprüfung am Pneumotest- bzw. Bodytestgerät durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Lungenfunktionswerte bestimmt.

Der Ablauf am Fahrradergometer war wie folgt:

(a) Entnahme eines Röhrchens ungestauten Venenbluts zur Bestimmung von ATP, Glucose, Pyruvat und Lactat. Das Blut wurde sofort enteiweißt.

(b) Der Proband wurde nun einige Zeit in den Ganzkörperplethysmographen gesetzt und atmete durch ein Mundstück ein, um sich an Umgebung und Atmungsweise zu gewöhnen. Die Nase wurde mit einer Nasenklemme verschlossen.

(c) Nach Bestimmung der Lungenfunktionswerte wurde der Proband auf das Fahrradergometer gesetzt. Zu Kontrollzwecken wurde ein EKG geschrieben und der Blutdruck gemessen. Gleichzeitig registrierte das Monitor-EKG auch die Pulsfrequenz.

(d) Für die ersten Minuten wurden die Ruhebedingungen registriert; die Mittelwerte von Puls und respiratorischem Quotienten wurden für andere Zwecke bestimmt.

(e) Beginn der ergometrischen Belastung mit Null Watt und Umdrehungszahl ca. 60/min. Dauer 1 min.
Durch ein Anzeigegerät konnte der Proband die Umdrehungszahl kontrollieren; nach Möglichkeit sollte diese Umdrehungszahl während des ganzen Versuchs eingehalten werden. Am Ergometer wurde die drehzahlunabhängige Watteinstellung gewählt, d.h. bei langsameren Treten mußte die Kraft größer werden um die Leistung auf alle Fälle konstant zu halten.

(f) Steigerung der Wattzahl um 20 Watt pro Minute

(g) Bei einer Frequenz von 100 - 130/min war das Steady-State erreicht. In dieser Phase wurde die Wattzahl für 3 Minuten beibehalten.

(h) Nach dem Steady-State wurde die Wattzahl wieder um 20 Watt pro Minute bis zur Leistungsgrenze des einzelnen Probanden gesteigert. Unmittelbar nach der maximalen Belastung wurde zur Bestimmung von ATP, Glucose, Pyruvat und Lactat ungestautes Venenblut entnommen, das sofort enteiweißt wurde. Ferner wurden Blutdruck und EKG zu Kontrollzwecken registriert.

2.3. Zweitversuch

Der Zweitversuch fand genau 7 Tage später, jeweils am gleichen Wochentag statt. Die Probanden erhielten die Anweisung, täglich zu den Mahlzeiten 3 x 2 Tabletten VASODISTAL (á Tabl. 200 mg) einzunehmen. Erste Einnahme war am Abend des Erstversuchs, letzte Einnahme am Mittag vor dem Zweitversuch.
Insgesamt waren 42 Tabletten einzunehmen. Der Aufbau des Zweitversuchs entsprach dem des Erstversuchs.

III. L A B O R M E T H O D I K

1. ATP-Bestimmung im Vollblut

Die enzymatische Bestimmung der Konzentration des Adenosin-5-triphosphats erfolgte am Photometer "Eppendorf" in Anlehnung an die Methode von TH. BÜCHER. Der Apparat war mit einem Kompensationsschreiber gekoppelt. Der heizbare Küvettenhalter wurde konstant auf 25°C gehalten und die Messung gegen Luft bei einer Wellenlänge von 365 nm vorgenommen.

1.1. Prinzip

ATP phosphoryliert in der von 3-Phosphoglyceratkinase (PKG) katalysierten Reaktion Glycerat-3-phosphat zu Glycerat-1,3-diphosphat:

(a) Glycerat-3-phosphat + ATP $\xrightarrow{PKG + Mg^{++}}$ Glycerat-1,3-diphosphat + ADP

Das entstandene Glycerat-1,3-diphosphat wird durch NADH zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat reduziert, wobei Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GADPH) als Katalysator wirkt:

(b) Glycerat-1,3-diphosphat + NADH + H^+ $\xrightarrow{GAPDH}$ Glycerinaldehyd-3-Phosphat + NAD + Phosphat.

Glycerinaldehyd-3-Phosphat wird durch Triosephosphatisomerase (TIM) in Dihydroxyacetonphosphat umgebildet:

(c) Glycerinaldehyd-3-Phosphat $\xrightarrow{TIM}$ Dihydroxyaceton-phosphat. Dihydroxyacetonphosphat wird in Anwesenheit von Glycerinphosphatdehydrogenase (GDH) als Katalysator durch NADH reduziert; es entsteht Glycerin-1-phosphat:

(d) Dihydroxyaceton-phosphat + NADH + H^+ $\xrightarrow{GDH}$ Glycerin-1-phosphat + NAD.

Die in den Reaktionen (b) und (d) verbrauchte Menge NADH ist äquivalent der doppelten Menge ATP. NADH wurde photometrisch bei Hg 354 nm bestimmt.

1.2. Bestimmungsmethode:

1.2.1. Reagenzien:

Lösung 1:	Triäthanolamin-Puffer pH 7,6	0,5	mol/l
	Magnesiumsulfat	4	mmol/l
	Glycerat-3-Phosphat	6	mmol/l
Lösung 2:	NADH	2,5	mmol/l
Lösung 3:	GAPDH	560	U/ml
	PKG	450	U/ml
	GDH	80	U/ml
	TIM	1000	U/ml

1.2.2. Enteiweißung:

4,0 ml 0,6 N Perchlorsäure (eiskalt) werden mit 1,0 ml ungestautem Venenblut gemischt, 10 min. bei 20 - 25°C stehengelassen und anschließend bei 3000 U/min 10 min. zentrifugiert.

1.2.3. Bestimmungsansatz:

In eine 10 mm Küvette wurden pipettiert:
2,00 ml Lösung 1,
0,20 ml Lösung 2 und
0,20 ml Überstand nach Enteiweißung.

Der Ansatz wurde mit dem Plastikstab gemischt und die Extinktion E_1 nach 3-4 min. gemessen. Danach wurden 0,2 ml der Lösung 3 zugegeben und nach Stillstand der ablaufenden Reaktion (10 min) die Extinktion E_2 gemessen.

Durch Multiplikation der Extinktionsdifferenz $E_1 - E_2 = E$ mit dem Umrechnungsfaktor 438 erhält man die ATP-Konzentration in mg/100 ml.
Zur Kontrolle wurde jeder Wert doppelt bestimmt und der Mittelwert zur Auswertung herangezogen.

2. Bestimmung der Glucose im Vollblut:

2.1. Prinzip (nach F.H. SCHMIDT)

Glucose wird in der durch Hexokinase katalysierten enzymatischen Reaktion durch ATP zu G-6-P phosphoryliert.

$$\text{Glucose} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{Hexokinase}} \text{G-6-P} + \text{ADP}$$

Durch das Enzym Glucose-6-phosphatdehydrogenase wird G-6-P in Gegenwart von NADP in Gluconat-6-P überführt.

$$\text{G-6-P} + \text{NADP}^+ \rightleftharpoons \text{Gluconat-6-P} + \text{NADPH} + \text{H}^+$$

Die aus NADP entstehende NADPH-Menge ist äquivalent der G-6-P bzw. Glucose-Menge. NADPH ist Meßgröße

und aufgrund seiner Absorption bei Hg 365 nm zu bestimmen.

2.2. Bestimmungsmethode:

2.2.1. Reagenzien:

Lösung 1: 0,3 M Triäthanolaminpuffer (pH 7,5, 4 mM $MgSO_4$
Lösung 2: 12 mM NADP
Lösung 3: 15 mM ATP
Lösung 4: HK/G6P-DH 3 125 U/ml

2.2.2. Enteiweißung:

1,0 ml ca. 0,33 N Perchlorsäure (eiskalt) werden mit 0,1 ml Blut aus ungestauter Vene gemischt und anschließend 10 min zentrifugiert.

2.2.3. Bestimmungsansatz:

2,50 ml Lösung 1
0,20 ml Überstand nach Enteiweißung
0,10 ml Lösung 2
0,10 ml Lösung 3

wurden mit dem Plastikspatel gut gemischt und die Extinktion E_1 gemessen. Danach Zugabe von 0,002 ml Lösung 4.
Nach dem Stillstand der Reaktion (10 min) wurde E_2 abgelesen. Der Bestimmungsansatz wurde jeweils doppelt gebildet und daraus der Mittelwert gebildet.
Nach Berechnung der Extinktionsdifferenz $E_1 - E_2 = E$ wurde die Glucosekonzentration über E aus der Wertetabelle der Fa. Boehringer entnommen, deren Reagentien-

Test-Combination für den Test benutzt wurde.

3. Pyruvatbestimmung im Vollblut:

3.1. Prinzip (nach CZOCK, R.; LAMPRECHT, W.)

Pyruvat wird durch NADH und H^+ zu Lactat reduziert, wobei Lactatdehydrogenase die Reaktion katalysiert:

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + H^+ \overset{\text{LDH}}{\rightleftharpoons} \text{L-Lactat} + NAD^+$$

Unter den Meßbedingungen liegt das Gleichgewicht der Reaktion auf der Seite von L-Lactat + NAD^+, so daß ein quantitativer Umsatz garantiert ist, solange die NADH-Konzentration nicht kleiner als 0,01 mM ist (nach HOHORST, H.J., McQUATE, J.T., RODWELL, V.W. et al.).

Die Oxydation des NADH ist den Substratumsätzen proportional. NADH kann photometrisch bei 365 nm bestimmt werden.

3.2. Bestimmungsmethode:

3.2.1 Reagenzien:

Lösung 1:	Trikaliumphosphat	0,7 M
Lösung 2:	NADH	2,5 mM
Lösung 3:	LDH	900 U/l

3.2.2. Enteiweißung:

5 ml 1,0 N Perchlorsäure (eiskalt) werden mit 5,0 ml Blut aus ungestauter Vene gemischt und anschließend 10 min bei 3.000 U/min zentrifugiert.

3.2.3. Pufferung:

5 ml des Überstandes werden mit 2,5 ml der Lösung 1 versetzt, 15 min in ein Eisbad gestellt und anschliessend filtriert.

3.2.4. Bestimmungsansatz:

In eine Glasküvette von 1 cm Schichtdicke werden nacheinander pipettiert:

2 ml Filtrat und 0,20 ml der Lösung 2.
Nach dem Mischen erfolgte die Bestimmung der Extinktion E_1.
Zugabe von 0,02 ml der Lösung 3 und erneutes Mischen. Nach ca. 5-10 min kommt die Reaktion zum Stillstand, die Extinktion E_2 kann abgelesen werden.
Der Pyruvatwert in mg/100 ml ergibt sich aus der Multiplikation der Extinktionsdifferenz $E = E_1 - E_2$ mit dem Faktor 7,97.
Der Bestimmungsansatz wurde jeweils doppelt durchgeführt und der Mittelwert zur Auswertung herangezogen.

4. Lactatbestimmung im Vollblut:

4.1. Prinzip (nach GUTHMANN, J., WAHLEFELD, A.W.)

L-Lactat wird in der von Lactat-Dehydrogenase katalysierten enzymatischen Reaktion durch NAD zu Pyruvat oxydiert.

$$\text{L-Lactat} + NAD^+ \overset{LDH}{\rightleftharpoons} \text{Pyruvat} + NADH + H^+$$

Das Reaktionsgleichgewicht liegt weit auf der Seite von L-Lactat und NAD. Nach HORHORST beträgt die Gleichgewichtskonstante $K = 2{,}9 \times 10^{-12}$ Mol/l bei einer Temperatur von 25°C. Aus diesem Grund müssen zur quantitativen Dehydrierung Pyruvat und NADH + H^+ als Reaktionsprodukte aus dem Gleichgewicht entfernt werden: Protonen werden durch ein alkalisches Reaktionsmedium, Pyruvat unter NAD-Überschuß als Hydrazon abgefangen:

$$\text{L-Lactat} + NAD + \text{Hydrazin} \xrightarrow[pH=9,0]{LDH} \text{Pyruvat-Hydrazon} + NADH^+ + H_3^+.$$

Nach HOHORST liegt die Gleichgewichtskonstante dieser Reaktion bei hohem NAD-Überschuß und einer relativ hohen LDH-Aktivität bei 25°C und einem pH von 9,4 bei $K = 7 \times 10^{12}$ Mol/l, d.h. Lactat und NAD werden in ausreichend kurzer Zeit umgesetzt.

Die gebildete NADH-Menge ist der L-Lactatmenge äquivalent und kann bei HG 365 nm photometrisch bestimmt werden.

Spezifität der Untersuchung:
Es wird nur L-(+)-Lactat (Fleischmilchsäure) erfaßt. D-Lactat reagiert nicht. Racemate werden nur zu 50% umgesetzt. Außer L-(+)-Lactat reagieren in geringem Maße auch beta-Hydroxybutyrat und beta-Chlorlactat.

4.2. Bestimmungsmethoden:

4.2.1. Reagenzien:

Lösung 1: 0,5 M Glycinpuffer (pH 9,0), 0,4 M Hydrazin
Lösung 2: 27 mM NAD
Lösung 3: LDH (2mg LDH/ml).

4.2.2. Enteiweißung:

1,0 ml 0,6 N Perchlorsäure (eiskalt) werden mit 0,5 ml Blut aus ungestauter Vene gemischt und anschliessend 10 min zentrifugiert.

4.2.3. Bestimmungsansatz:

In die Reagenzgläser werden pipettiert:

200 ml Lösung 1
0,20 ml Überstand nach Enteiweißung
0,20 ml Lösung 2
0,02 ml Lösung 3

Für die spätere Bestimmung ist ein Reagention-Leerwert erforderlich; dafür wird der Überstand nach Enteiweißung durch 0,20 ml Perchlorsäure ersetzt.
Anschließend werden Proben und Leerwert für 60 min in ein Wasserbad von 25°C gebracht.

Nach Messung der Extinktionen der Proben und des Leerwerts gegen Luft wird die Extinktionsdifferenz

$$E = E_{Probe} - E_{Leerwert}$$

mit dem Berechnungsfaktor 91,3 multipliziert und daraus der Lactatgehalt des Blutes in mg/100 ml bestimmt.

5. Bestimmung des Hämatokrits:

Frisch entnommenes Venenblut wurde in heparinisierten Glaskapillaren aufgezogen, das Kapillarende zugeschmolzen und 15 min bei 10.000 U/min in der Mikrohämatokritzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurde der Hämatokritwert mit Hilfe des HAWKSLEY-READERS abgelesen.

6. Bestimmung des Natrium- und Kaliumgehalts von Serum und Vollblut

Die Bestimmung erfolgte mit dem Flammenphotometer. Nach Zentrifugieren wurde der jeweilige Serumwert doppelt bestimmt und der Mittelwert zur Auswertung herangezogen. Kalium und Natrium im Vollblut wurden nur einmal bestimmt.

7. Berechnung des Natrium- und Kaliumgehalts der Erythrozyten

Aus den Serum- und Vollblutwerten wurde die Konzentration in den Erythrozyten mit Hilfe des Hämatokrits nach folgender Formel bestimmt:

$$G_E = \left(G_B - G_S \quad (1 - \frac{H}{100}) \right) \frac{100}{H} \quad \text{mval/l}$$

G_E	= Gehalt der Erythrozyten	mval/l
G_B	= Gehalt des Blutes	mval/l
G_S	= Gehalt des Serums	mval/l
H	= Hämatokrit	(Vol % der Zellen im Vollblut)

8. Ergometrie

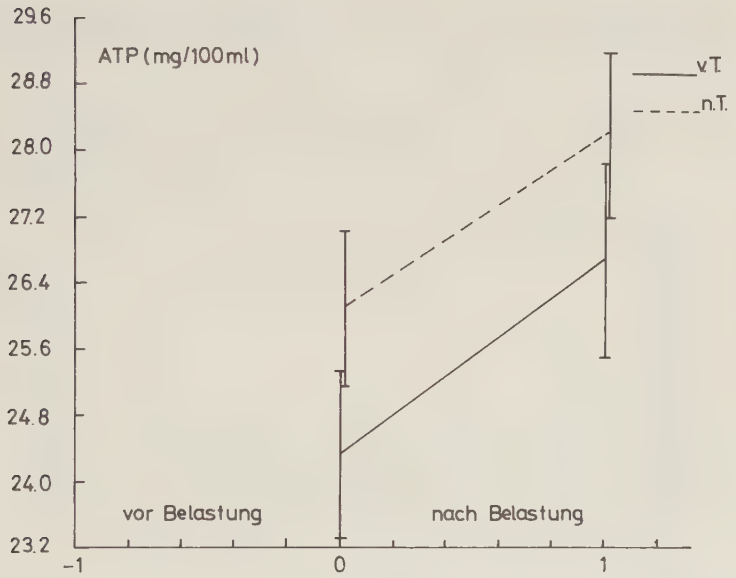
Wir verwendeten das Ergometer Ergotest Er-1 der Fa. Jaeger, bei dem wir die drehzahlunabhängige Watteinstellung wählten.

9. Statistische Auswertung der Ergebnisse:

Aus den gefundenen Meßwerten wurde bei allen Untersuchungen der Mittelwert, die Standardabweichung und der mittlere Fehler des Mittelwertes berechnet. Die senkrechten Balken in den Diagrammen geben den mittleren Fehler des Mittelwertes (MFM) an. Die Prüfung der Werte vor und nach Tabletteneinnahme auf Signifikanz wurde mittels des Wilcoxon-Tests paarweise durchgeführt. Der Unterschied zweier Meßreihen wurde als signifikant angenommen, wenn die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% abzulehnen, d.h. wenn 2 p kleiner als 0,05 war.

IV. E R G E B N I S S E

1. Verhalten von ATP im Vollblut (mg/100 ml)

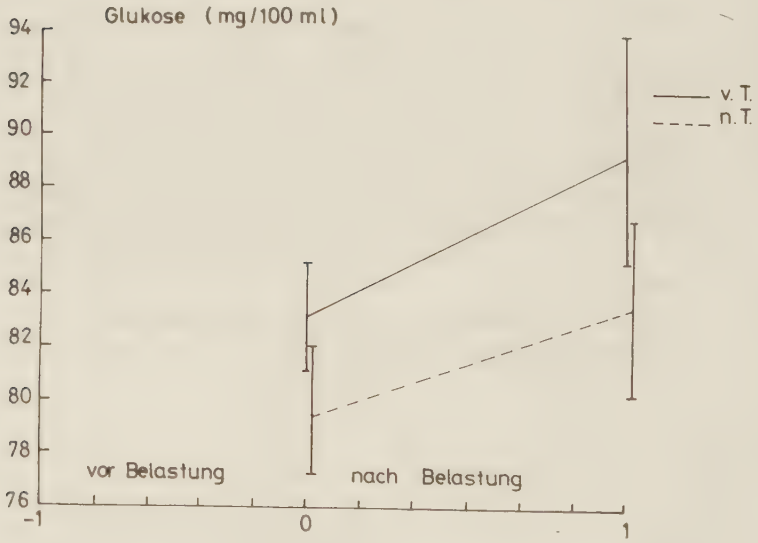


		MW	Streuung	MFM	Signifikanz
(a)	vor Belastung				
	v. T. (vor Tabl.)	24,33	4,51	1,00	p o,131
	n. T. (nach Tabl.)	26,11	4,26	0,95	n. s.
(b)	nach Belastung				
	v. T.	26,70	5,27	1,18	p o,103
	n. T.	28,22	4,47	1,00	n. s.

Im Serum ist ATP normalerweise nicht vorhanden, da es ausschließlich intrazellulär vorkommt. Wir bestimmten es im Vollblut. Zur Beurteilung s. Diskussion.
Normalwerte lt. Literatur:

DENNEMANN: 19-32; GROSS: 29,3; HOETZEL 10-26; LAUDAHN 10-26 mg/100 ml.

2. Verhalten von Glucose im Vollblut (mg/100 ml)

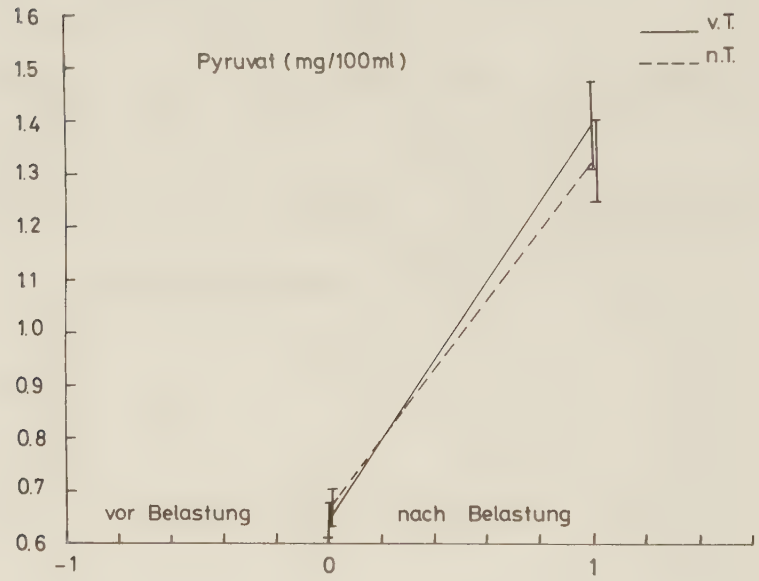


(a) vor Belastung	MW	Streuung	MFM	Signifikanz
v. T.	83,18	8,93	2,00	p 0,194
n. T.	79,65	10,76	2,41	n. s.

(b) nach Belastung	MW	Streuung	MFM	Signifikanz
v. T.	89,05	17,27	3,86	p 0,131
n. T.	83,63	14,39	3,22	n. s.

Signifikante Veränderungen sind nicht feststellbar. Die Normalwerte werden bei RICK für Kapillarblut mit 60 - 100 mg/100 ml und 1-2 Stunden nach kohlehydratreicher Mahlzeit mit bis 130 mg/100 ml angegeben. Die Versuche fanden nachmittags statt, die Probanden waren zumeist nicht nüchtern.
Die Mittelwerte liegen im Normbereich.

3. Verhalten von Pyruvat im Vollblut (mg/100 ml)

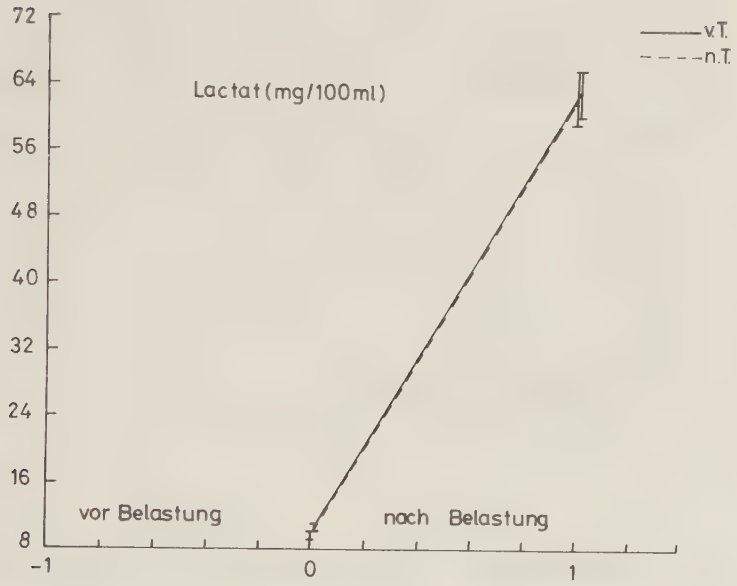


(a) vor Belastung	MW	Streuung	MF	Signifikanz
v. T.	0,65	0,15	0,034	p 0,789
n. T.	0,67	0,16	0,036	n. s.

(b) nach Belastung				
v. T.	1,38	0,37	0,080	p 0,597
n. T.	1,34	0,34	0,078	n. s.

Signifikante Änderungen ergaben sich nicht. Für Nüchternblut gibt LANDON Normwerte mit 0,36 - 0,59 mg/100 ml an. Unsere Werte lagen über diesen Normwerten, jedoch waren unsere Probanden nicht nüchtern.

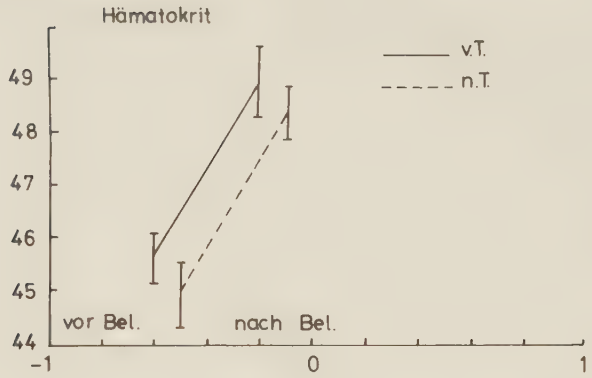
4. Verhalten von Lactat im Vollblut (mg/100 ml)



		MW	Streuung	MFM	Signifikanz
(a)	vor Belastung				
	v. T.	9,67	2,37	0,53	p 0,615
	n. T.	10,62	2,35	0,53	n. s.
(b)	nach Belastung				
	v. T.	62,71	14,93	3,34	p 0,776
	n. T.	63,15	12,70	2,84	n. s.

Keine signifikanten Veränderungen. Die Normalwerte werden von LAUDAHN mit 9-16 mg/100 ml angegeben.

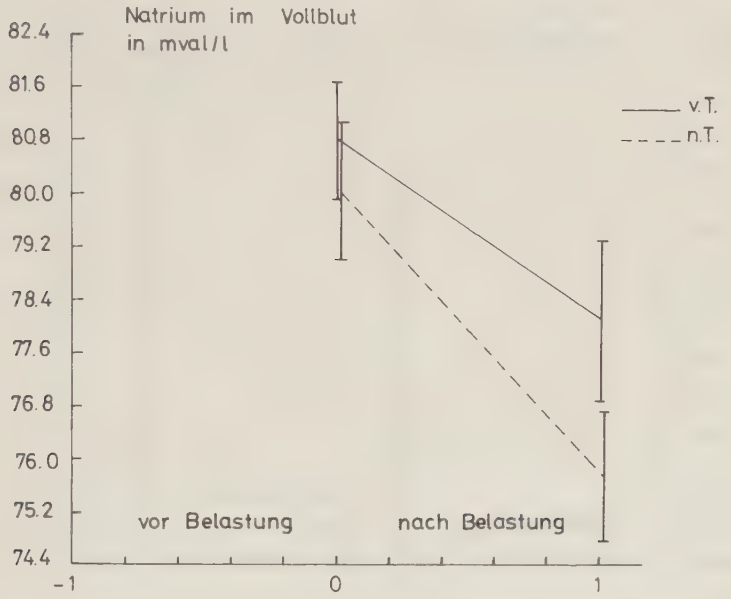
5. Verhalten des Hämatokrits



		MW	Streuung	MFM	Signifikanz
(a)	vor Belastung				
	v. T.	45,63	2,28	0,51	
	n. T.	44,91	2,22	0,49	n. s.
(b)	nach Belastung				
	v. T.	48,96	3,00	0,67	
	n. T.	48,42	2,42	0,54	n. s.

Der Normwert beträgt lt. Literatur für Männer 42-52%. Die gefundenen Werte liegen in diesem Bereich, signifikante Änderungen traten nicht auf.

6. Verhalten von Natrium im Vollblut (mval/l)

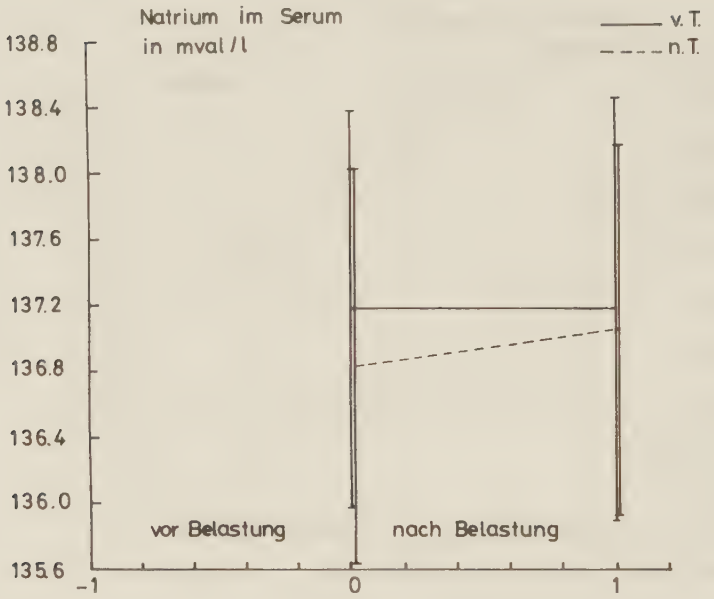


(a) vor Belastung	MW	Streuung	MFM	Signifikanz
v. T.	80,80	3,96	0,88	
n. T.	80,05	4,63	1,03	n. s.

(b) nach Belastung				
v. T.	78,10	5,47	0,12	
n. T.	75,75	4,44	0,99	n. s.

Keine signifikanten Veränderungen.

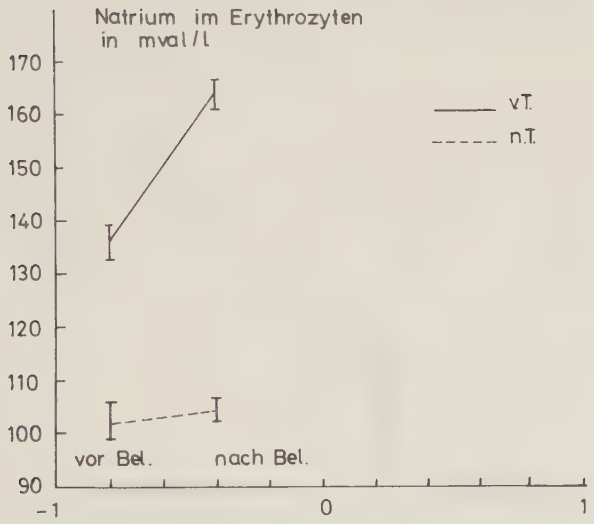
7. Verhalten von Natrium im Serum (mval/l)



		MW	Streuung	MFM	Signifikanz
(a)	vor Belastung				
	v. T.	137,2	5,39	1,20	
	n. T.	136,8	5,34	1,19	n. s.
(b)	nach Belastung				
	v. T.	137,2	5,70	1,27	
	n. T.	137,0	5,02	1,12	n. s.

Keine signifikanten Veränderungen. Die Werte liegen innerhalb des von RICK angegebenen Rahmens von 135-150 mval/l Serum.

8. Verhalten von Natrium in Erythrozyten (mval/l)

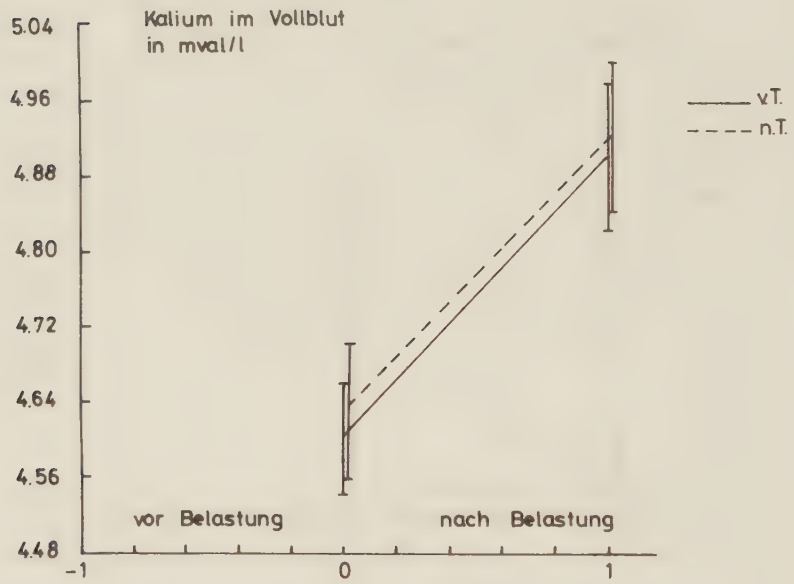


(a) vor Belastung	MW	Streuung	MFM	Signifikanz
v. T.	136,0	8,35	1,86	
n. T.	101,17	12,44	2,78	n. s.

(b) nach Belastung				
v. T.	164,3	12,60	2,81	
n. T.	104,7	8,72	1,95	n. s.

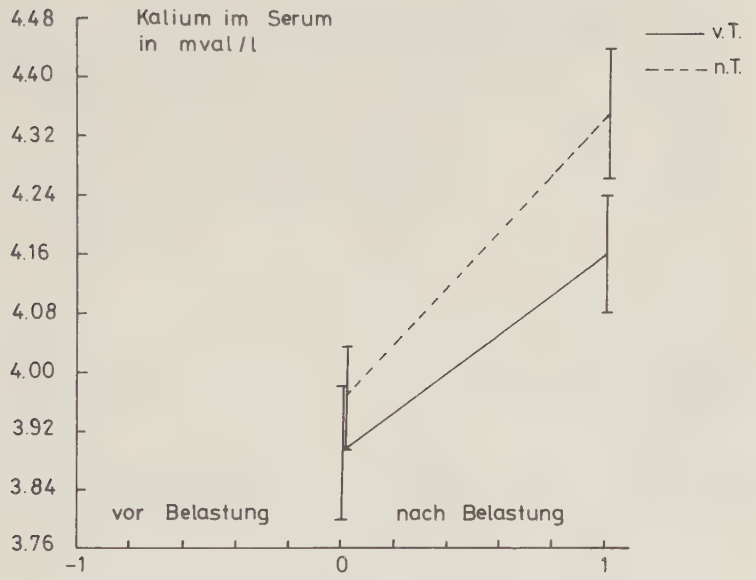
Es ergaben sich keine signifikanten Abweichungen.

9. Verhalten von Kalium im Vollblut (mval/l)



		MW	Streuung	MFM	Signifikanz
(a)	vor Belastung				
	v. T.	4,60	0,25	0,060	
	n. T.	4,63	0,32	0,073	n. s.
(b)	nach Belastung				
	v. T.	4,90	0,32	0,076	
	n. T.	4,92	0,35	0,079	n. s.

10. Verhalten von Kalium im Serum (mval/l)

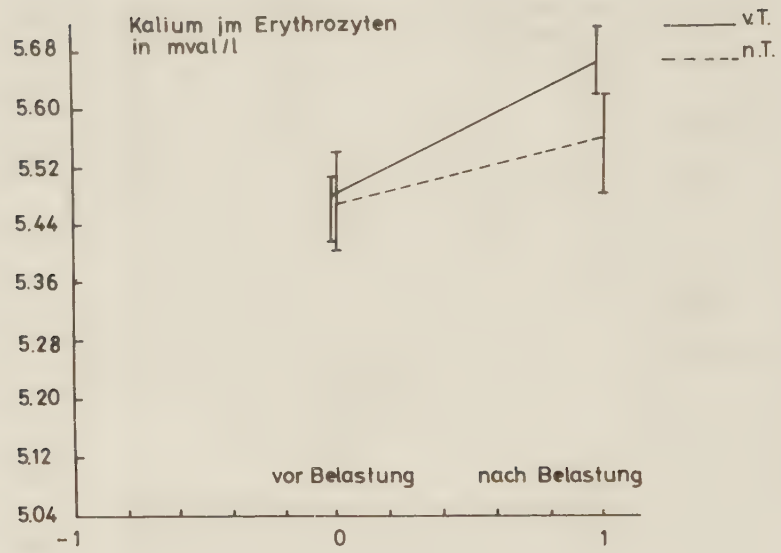


(a) vor Belastung	MW	Streuung	MFM	Signifikanz
v. T.	3,89	0,41	0,09	
n. T.	3,96	0,31	0,07	n. s.

(b) nach Belastung				
v. T.	4,16	0,35	0,07	
n. T.	4,35	0,39	0,08	n. s.

Keine signifikanten Veränderungen. Die Werte liegen innerhalb des in der Literatur angegebenen Normbereichs von 3,6-5,2 mval/l.

11. Verhalten von Kalium im Erythrozyten (mval/l)



		MW	Streuung	MFM	Signifikanz
(a)	vor Belastung				
	v. T.	5,46	0,72	0,17	
	n. T.	5,43	0,67	0,15	n. s.
(b)	nach Belastung				
	v. T.	5,64	0,61	0,14	
	n. T.	5,51	0,77	0,17	n. s.

Es waren keine signifikanten Veränderungen feststellbar.

V. D I S K U S S I O N

Bei der Behandlung der arteriellen Verschlußkrankheit stehen die Elimination der Risikofaktoren, die Normalisierung von Stoffwechselabweichungen und körperliches Training zur Ausbildung suffizienter Kollateralen im Vordergrund. Nach Überprüfung eventueller chirurgischer Indikationen kommen in der konservativen Therapie vor allem ab Stadium II b nach FONTAINE gefäßerweiternde Substanzen (Vasodilatatoren) zum Einsatz.

Es gibt eine Vielzahl von Präparaten, die eine Verbesserung der arteriellen Durchblutung zum Ziel haben. Eine große Bedeutung bei der Regulation des Blutdrucks und der Blutverteilung spielen dabei körpereigene Substanzen wie Kallikrein und Adenosin, bzw. Präparate, die deren Wirkung erhöhen, wie z.B. PADUTIN oder VASODISTAL.

Untersuchungen am Herzen haben ergeben, daß nicht die arterielle O_2-Konzentration, sondern Änderungen des kapillarvenösen O_2-Gehaltes (bzw. des zellulären PO_2) streng zu den vasomotorischen Effekten korreliert sind. Als Bindeglied werden sauerstoffabhängige Veränderungen des Myokardstoffwechsels diskutiert, die zur Bildung und Freisetzung vasoaktiver Metaboliten führen, deren dilatatorische Wirkung zu einer vermehrten Sauerstoffzufuhr und zur Wiederherstellung einer normalen Stoffwechsellage führen. Bei Hypoxie kommt es zu einem Rückgang des aeroben Stoffwechsels, zur Abnahme der Synthese von ATP und zum Absinken der Konzentration energiereicher Phosphate. Bei der Ausnützung der noch vorhandenen energiereichen Phosphatbin-

dungen erfolgt ein Abbau über ADP und AMP zu Adenosin, das die Zellmembran permeiren und vasoaktiv werden kann. Darüber hinaus kommt es bei Hypoxie zu einer Aktivierung des Kallikrein-Systems und zu einer vermehrten Bildung von Bradykinin, das eine noch stärkere dilatatorische Wirkung als Adenosin hat. ADP und AMP stimulieren ferner die Glykolyse.

ARCH et al. sehen im Adenosin ein lokales Hormon, das wie die Prostaglandine seine Wirkungen hauptsächlich in dem Organ entfaltet, in dem es produziert wird. Obwohl die biochemischen Mechanismen der Kontrolle seiner Konzentration in verschiedenen Geweben ähnlich sein mögen, sind die Wirkungen des Adenosins - vermutlich erklärbar über verschiedene Rezeptoren wie bei den Katecholaminen - in den einzelnen Geweben sehr unterschiedlich. So wurde beobachtet, daß die Injektion von Adenosin bei Säugern eine Senkung des arteriellen Blutdrucks, eine dilatation der Koronararterien und eine Herabsetzung der Darmmotilität hervorrief. HADDY (zit. nach ARCH) wies nach, daß physiologische Konzentrationen von Adenosin am Herzen, am Skelettmuskel, im Gehirn, am Darm und im Fettgewebe im Tierversuch vasoditatierend wirken. Nach BERNE (zit. nach ARCH) verursacht Adenosin eine Relaxation der glatten Muskulatur der Koronararterien, was zur Vasodilatation und zur vermehrten Durchblutung und Sauerstoffversorgung führt. Er stellte eine positive Korrelation zwischen der Freisetzungsrate des Adenosins (und seiner Metabolite) am perfundierten Herzen, der festgestellten Konzentration des myokardialen Adenosins, der koronaren Durchblutung und dem Grad der kardialen Hypoxie fest. Eine geringe Herabsetzung der Sauerstoffversorgung des Herzens führte zu einem schnellen

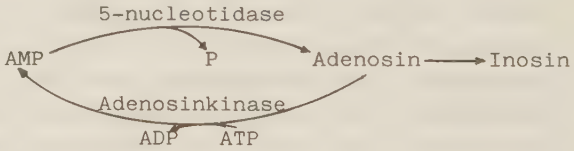
Anstieg des myokardialen Adenosinspiegels und der Freisetzung von Adenosin in den Extrazellulärraum. Er stellte ferner fest, daß Substanzen, die zu einer Erhöhung der Konzentration des Adenosins im Extrazellulärraum des Herzens führen, als koronare Vasodilatatoren wirksam sind.
In Niere und Leber verursachte Adenosin eine Vasokonstriktion. Im Tierversuch antagonisierte Adenosin die morphininduzierte Analgesie und beugte Konvulsionen vor. Ferner konnte eine neuroinhibitorische Wirkung nachgewiesen werden. Einen interessanten Aspekt bietet die beobachtete Herabsetzung der Thrombozytenaggregation durch Adenosin: die Freisetzung aus ungenügend oxygeniertem Gewebe verhindert die Thrombenbildung und beugt so der weiteren Verminderung der Sauerstoffversorgung vor. Die antithrombotische Wirkung des Dipyridamol wird auf die Potenzierung der antithrombotischen Wirkung endogenen Adenosins zurückgeführt. Weitere beobachtete Wirkungen des Adenosins sind eine Hemmung der Lymphozyten- und Lymphoblastenproliferation und eine Steigerung der Erythropoese. An der glatten Muskulatur von Säugern fand man eine Relaxation der Bronchiolen, der Harnblase und des Darms, während die Wirkungen auf die Uterusmuskulatur nicht einheitlich waren.

Nach GROSS sind pharmakologisch wirksame Substanzen häufig unter Belastungsbedingungen besonders gut zu testen, bzw. ist es unter Belastung besonders gut möglich, Ergebnisse anderer klinischer Prüfungen zu ergänzen oder auch zu widerlegen. Bei der Testung unter ergometrischer Belastung kann man dabei in Kombination mit der Auswertung entsprechender spirometrischer und Laborwerte zu detaillierten Aussagen über die Stoffwechselwirkungen bestimmter Substanzen gelangen.

Bei den Stoffwechselstudien unter ergometrischer Belastung von GROSS et al. über Kallikrein und dieser Studie über VASODISTAL interessierte insbesondere das Verhalten der für den Energieumsatz wichtigen Parameter ATP, Glucose, Pyruvat und Lactat. Darüber hinaus bestimmte ich noch das Verhalten von Natrium in Vollblut, Serum und Erythrozyten, ebenso das des Kaliums.

Nach ARCH ist Adenosin von vielen Autoren als eine Substanz betrachtet worden, welche die intrazelluläre Nukleotidkonzentration beeinflußt. In der Literatur wird berichtet, daß exogenes Adenosin den Gehalt einer Reihe von Geweben an AMP, ADP und besonders ATP erhöht, aber es gibt ebenso Berichte darüber, daß dies nicht oder erst nach Entleerung der Speicher geschieht.

Schematischer Stoffwechselweg von Adenosin:



Die von CASTELLANI gefundene Potenzierung der Wirkung körpereigenen Adenosins durch VASODISTAL wäre z. B. über einen verminderten Abbau oder eine vermehrte Freisetzung von Adenosin vorstellbar. Adenosin wird durch die Adenosinkinase intrazellulär zu AMP phosphoryliert, dabei entsteht aus ATP das ADP. In Untersuchungen wurde bis zu 20 % der Aktivität der Adenosin-

kinase an Zellmembranen gefunden. Geringe Erhöhungen der Kaliumkonzentration in unmittelbarer Umgebung der Zelle, wie sie z. B. durch Membrandepolarisation oder Hypoxie auftreten, führen danach über die Inhibierung der Aktivität der Adenosinkinase zu einer Erhöhung der Konzentration des Adenosins und des ATP und damit zu einer Veränderung der Stoffwechsellage in Richtung einer Einsparung energiereicher Phosphate.

Wir konnten in unserer Untersuchung weder bei Kalium noch beim ATP signifikante Veränderungen feststellen. Zwar lagen die Werte für Kalium in Serum und Vollblut und von ATP nach Tabletteneinnahme über den Leerwerten. Die aus dem Kurvenverlauf ersichtliche Tendenz - die sich nach den oben gemachten Ausführungen als Veränderung des Stoffwechsels im Sinne einer Einsparung energiereicher Phosphate interpretieren ließe - war somit statistisch nicht zu sichern. Aber auch bei einer signifikanten Erhöhung der ATP-Konzentration wäre die Bewertung schwierig. ATP kommt normalerweise ausschließlich intrazellulär vor. Lediglich unter der Voraussetzung, daß die von mir durchgeführte Bestimmung des ATP im Vollblut einen brauchbaren Maßstab für den Gehalt der Zellen an ATP darstellt, könnten m. E. aus einer Erhöhung Schlüsse auf eine Stoffwechselwirkung gezogen werden. Dazu kommt, daß physiologisch die Werte nicht nur interindividuell sondern auch intraindividuell von Tag zu Tag stark schwanken, was sich auch in der großen Streuung ausdrückt.

Hohe Dosen oder hohe Konzentrationen von Adenosin inhibieren nach der Literatur die Gluconeogenese, die Lipogenese und die Fettoxydation in der Leber. Physiologisch von größerer Bedeutung sind Berichte

über eine Stimulierung der Steroidproduktion durch adrenerge Zellen, eine Erhöhung des Plasmaspiegels der Corticosterone und einer Inhibierung der Insulinproduktion isolierter Langerhans'scher Inselzellen. Dagegen führt Adenosin zusätzlich zu seinem antilipolytischem Effekt im Fettgewebe zu einer Stimulierung der Glucoseoxydation durch Insulin. Deshalb glaubt ARCH annehmen zu dürfen, daß die Inhibierung excessiv angehäuften cAMP's durch Adenosin nötig sei, um die Glucoseoxydation und vielleicht auch die Lipogenese zu verstärken.

Bei der Glucose waren die von uns gefundenen Werte nach Belastung höher als bei den Ausgangsversuchen. Jedoch waren die Werte nach Tabletteneinnahme insgesamt vermindert. Auch zeigte sich nach Tabletten ein geringerer Anstieg als für den entsprechenden Wert vor Tabletteneinnahme. Dazu ist zu bemerken, daß sich die Versuchspersonen bei maximaler Belastung in einer erheblichen Streßsituation befanden, dazu kam die für sie ungewohnte Versuchssituation. Bei Streß kommt es zu einer erhöhten Freisetzung von Katecholaminen ins Blut. Diese werden von adrenergen beta-Zellen gebunden und stimulieren dadurch das membrangebundene Enzym Adenylcyclase, das die intrazelluläre Bindung von 3'5'-cAMP aus ATP katalysiert. 3'5'-cAMP aktiviert Proteinphosphokinasen, die ihrerseits durch Phosphorylierung inaktive in aktive Enzyme überführen. Auf diese Weise werden z. B. Lipolyse und Glykogenolyse beta-sympathomimetisch gesteigert.

Die aus dem Kurvenverlauf für Glucose erkennbare Tendenz zu niedrigeren Werten nach Tabletteneinnahme - die sich nach der vorliegenden Literatur als Zeichen

einer Inhibierung cyclischen AMP's durch Adenosin und einer dadurch verbesserten Glucoseoxydation durch Insulin deuten ließe - war statistisch nicht signifikant. Während jedoch die signifikante Abweichung des respiratorischen Quotienten unter PADUTIN von BURCHHARDT als Zeichen einer besseren Utilisation der Glucose gedeutet wird, läßt sich eine solche Aussage nach HÖRLIN für VASODISTAL nicht treffen.

Beim Pyruvat konnten BURCHHARDT für PADUTIN und KRICHENBAUER für KALLIKREIN+INOSITNICOTINAT nach Tabletteneinnahme verminderte Werte feststellen. Bei BURCHHARDT waren die Werte vor, bei KRICHENBAUER nach Belastung signifikant verändert.
Wir konnten nach Tabletteneinnahme unter Belastung eine Herabsetzung des Pyruvatspiegels notieren, die jedoch statistisch nicht signifikant ist.

Beim Lactat konnten wir keine erwähnenswerten Veränderungen feststellen. Eine metabolische Azidose durch vermehrte Freisetzung von Milchsäure nach Tabletteneinnahme kann nach unserer Studie ausgeschlossen werden. Der Hämatokrit wurde lediglich zur Berechnung des Gehalts der Erythrozyten an Kalium und Natrium bestimmt.

Die Werte für Kalium und Natrium in Serum, Vollblut und Erythrozyten zeigten keine signifikanten Veränderungen. Es ist zu diskutieren, ob die Tendenz zu erhöhten Kaliumwerten im Extrazellulärraum über eine Inhibierung der Adenosinkinase zu der von CASTELLANI beschriebenen Potenzierung der Wirkung des Adenosins beiträgt.

VI. Z U S A M M E N F A S S U N G

VASODISTAL, ein Präparat, das nach CASTELLANI die Wirkung des körpereigenen Stoffes Adenosin potenziert, wurde in einer Dosis von täglich 3 x 2 Tabletten á 2oo mg über 7 Tage an 20 junge Testpersonen verabfolgt.
ATP, Glucose, Pyruvat und Lactat, sowie die Konzentrationen von Natrium und Kalium in Serum, Vollblut und Erythrozyten wurden vor und nach ergometrischer Belastung und vor und nach Gabe von VASODISTAL an 20 Probanden untersucht.

Dabei ergaben sich keine signifikanten Veränderungen. Aus den Ergebnissen sich abzeichnende Tendenzen zu niedrigeren Werten der Glucose und zu höheren Werten beim ATP nach Tabletteneinnahme, die sich nach der Literatur zum Adenosin als Zeichen einer verbesserten Glucoseoxydation durch Insulin über die Hemmung cyclischen AMP's bzw. als Einsparung energiereicher Phosphate durch Inhibierung der Adenosinkinase bei erhöhtem Kalium im Extrazellulärraum diskutieren ließen, waren statistisch nicht zu sichern.

Herrn Professor Dr. med. Gross danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für die freundliche Hilfe und Anleitung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. med. Franke, Direktor der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg, danke ich für die Übernahme des Korreferats und dafür, daß ich die Versuche und Arbeiten in seiner Klinik durchführen durfte.

Herzlichen Dank Frau Dr. Haubitz vom Rechenzentrum der Universität, die mir bei der statistischen Auswertung behilflich war.

Frau Wiegand danke ich für ihre Hilfe bei den ergometrischen Versuchen und Frl. Cirulis für die Einführung in die Untersuchungsmethoden und die Hilfestellung bei der Arbeit im Labor.

LITERATURVERZEICHNIS

ADAM, H. Adenosin-5-triphosphat-Bestimmung mit Phosphoglyceratkinase In: 9, 539

ARCH, J.R.S. NEWSHOLME The Control of the Metabolism and the Hormonal Role of Adenosine

Essays Biochem., 14, S. 83 - 123 1978

BUDDECKE, E. Grundriss der Biochemie, De Gruyter, 1977

BÜCHER, TH. Biochem. biophys. Acta (Amst.) 1 (1947) 292

BURCHHARDT, F. Dissertation, Univers. Würzburg, 1981

CZOCK, R. LAMPRECHT, W. In: Methoden der enzymatischen Analyse, H. U. Bergemeyer, 3. Auflage, Bd. II Verlag Chemie Weinheim, 1974, S. 1491

CASTELLANI Informationsmaterial der Fa. DELALANDE zu VASODISTAL

DENNEMANN, H. Z. Ges. Exp. Med., 134, 355 (1961)

FREY, E. K. KRAUT, H. WERLE, E. Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren, Enke, Stuttgart, 1968

FORTH, W.
HENSCHLER, D. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Wissenschaftsverlag, Mannheim, 1977, S. 99 ff. 207 ff.

GROSS, W. persönliche Mitteilungen

GUTMANN, J.
WAHLEFELD, A. W. In: Methoden der enzymatischen Analyse, H. U. Bergmeyer, 3. Auflage, Bd. II, Verlag Chemie Weinheim, 1974, S. 1510

HÖRLIN, H. persönliche Mitteilung

HOETZEL, H. A. Ärztliche Wochenschrift 13, 850, (1958)

HOHORST, H. J.
FRENTZ, F.
BÜCHER, TH. Biochem. Z. 332, 18, (1959)

KRICHENBAUER Dissertation Univ. Würzburg, 1977
LANDON, J. et al. J. Clin. Path. 15, 579 (1962)

MELLEROWICZ, H. Ergometrie, 2. Auflage, München, Urban und Schwarzenberg, 1977

NOWACKI, P. Die Bedeutung des Ventilatoren-RQ's bei ergometrischer Belastung. In: Kongreßbericht des I. Internationalen Seminars für Ergometrie

RICK, W. Klinische Chemie und Mikroskopie, Springer Verlag, Heidelberg, 1977

SCHMIDT, F.H. Klin. Wochenschrift, 39 (1961), S. 1244

SCHULTE

In: GROSS-SCHÖLMERICH, Lehrbuch der Inneren Medizin, Schattauer Verlag Stuttgart, 1977, S. 394 ff.

L E B E N S L A U F

Ich wurde am 4. August 1949 als Sohn des Schlossers Ernst Klum und seiner Ehefrau Erna, geb. Dinnebier in Obernburg/Main geboren.

Von 1955-1962 besuchte ich die Volksschule in Elsenfeld, danach die Realschule in Obernburg, die ich 1965 mit dem Zeugnis der "Mittleren Reife" abschloß.

Im Herbst 1965 begann ich eine Ausbildung im gehobenen Dienst der Bayer. Finanzverwaltung. Bis 1967 war ich Finanzschüler beim Finanzamt Amorbach, danach bis 1970 Finanzanwärter beim Finanzamt Aschaffenburg. Nach Ablegen der Steuerinspektorenprüfung wurde ich im Dez. 1970 zum Steuerinspektor ernannt. Danach war ich bis Mai 1976 als Sachbearbeiter bei Finanzämtern in München und Obernburg tätig.

Von Sept. 1971 bis Juli 1975 besuchte ich das Abendgymnasium für Berufstätige in München.

Nach dem Abitur begann ich im WS 1975/76 mit dem Medizinstudium an der Universität Würzburg. Die Ärztliche Vorprüfung legte ich im Aug. 1977, den 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im Aug. 1978, den 2. Abschnitt im Aug. 1980 und den 3. Abschnitt im Oktober 1981 ab.

Druckerei A. Stoedtner aus Würzburg